

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО”

НАУМЧУК ЮЛІЯ АНАТОЛІЇВНА

УДК 612.398:547.965

**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗНОЇ
СИСТЕМИ ДЛЯ ТЕСТУВАННЯ ГЛЮПРОТЕКТОРІВ
АСТРОЦИТІВ ЗОРОВОГО НЕРВУ**

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі біомедичної інженерії Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Максименко Віталій Борисович, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, декан факультету біомедичної інженерії.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Лиманська Ольга Юріївна**, Національний науковий центр «Інститут клінічної та експериментальної ветеринарної медицини НААН України», головний науковий співробітник лабораторії молекулярної діагностики;

доктор медичних наук, професор,
Горчакова Надія Олександрівна, Національний медичний університет імені О.О.Богомольця МОЗ України, професор кафедри фармакології.

Захист відбудеться *19 жовтня 2018 р. об 11 годині 00 хвилин* на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 4, ауд. 258).

З дисертацією можна ознайомитись у Науково-технічній бібліотеці ім. Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37). Відгуки на автореферат просимо надсилати за адресою: 03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 1, кімната 158, відділ вченого секретаря КПП імені Ігоря Сікорського.

Автореферат розісланий ____ *вересня 2018 р.*

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради Д 26.002.28, д.б.н., доц.

Галкін О.Ю.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Глаукома є провідною причиною незворотної сліпоти, пов'язаної з пошкодженням сітківки та зорового нерву (ЗН) (Casson et al., 2012). Приблизна кількість осіб, які страждають на глаукому, у 2013 р. становила 64,3 мільйони у світі, та постійно зростає (Foster et al., 2002; Quigley and Broman, 2006). Разом з тим, точні патофізіологічні механізми, які лежать в основі виникнення глаукоми є досі невстановленими (Bettin and DiMatteo, 2013; Chang and Goldberg, 2012), що ускладнює розробку ефективних методів лікування. В даний час більшість терапевтичних підходів спрямовані на зниження внутрішньо-очного тиску (ВОТ), що може лише уповільнити прояв симптомів захворювання, але в кінцевому підсумку не запобігає розвитку сліпоти.

Поряд з відомим набором антигіпертензивних офтальмологічних засобів, з'явилися докази високої ефективності нейропротекції (Chang and Goldberg, 2012; Farkas and Grosskreutz, 2001) та гліопротекції (Noh et al., 2013; Qu and Jakobs, 2013), яка здатна забезпечити збереження зорової функції в умовах постійного підвищеного внутрішньо-очного тиску (Burroughs et al., 2011 року; Prokai-Tatrai et al., 2013), а також при нормотензивній глаукомі (Mozaffarieh and Flammer, 2013; Mi et al., 2012).

Астроцити голівки зорового нерву (АГЗН), які є основним типом гліальних клітин в голівці зорового нерву, критично важливі для синтезу зовнішньоклітинного матриксу (Hernandez, 2000). За глаукоматозної ретинопатії в АГЗН ініціюються процеси реактивного астроцитозу, для яких характерна клітинна активація і міграція, ремоделінг зовнішньоклітинного матриксу та зміни в експресії генів та білків астроцитів (Morrison et al., 2011). Методи гліопротекції спрямовані на захист АГЗН та на запобігання розвитку реактивного астроцитозу. Наявні методи оцінки терапевтичного впливу гліопротекторів на голівку зорового нерву мають високу вартість та трудомісткість. Проблема недосконалості цих методів є перепорою на шляху розробки нових гліопротекторів. Її вирішення потребує нових біотехнологічних рішень.

Наша робота спрямована на біотехнологічне створення інформативної системи оцінки ефективності гліопротекторних фармакологічних субстанцій на основі вивчення фізико-хімічних і біохімічних основ життєдіяльності, закономірностей росту і розвитку клітинних культур АГЗН при глаукомі та під впливом гліопротекторних лікарських субстанцій.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в межах науково-дослідної роботи кафедри біомедичної інженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського (№ д/р 0113U002334, код КВНТД: 1.212.11.17, №2613-ф) «Діагностика станів серцево-судинної системи людини на основі

гемодинамічних та метаболічних характеристик» (2014-2016 pp.), а також проекту «Method development for drug screening in glaucoma» (2015-2018 pp.) (Department of Molecular Pharmacology, Loyola University Chicago).

Мета дослідження: наукове обґрунтування та розробка біотехнологічного методу ефективної оцінки гліопротекторного потенціалу фармакологічних субстанцій на основі системи тестів оксидативного стресу в клітинній культурі астроцитів голівки зорового нерву при глаукомі.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні **завдання:**

1. Отримання та оптимізація умов культивування первинної культури АГЗН щурів.
2. Розробка та валідація тесту вивільнення лактатдегідрогенази (ЛДГ) для культури АГЗН.
3. Верифікація дії tBHP як індуктора оксидативного стресу для АГЗН.
4. Оцінка ефектів оксидативного стресу та гіпербаричного тиску на АГЗН.
5. Порівняльна оцінка розроблених та наявних методик тестування фармакологічних субстанцій для захисту АГЗН з використанням прототипних антиоксидантів

Об'єкт дослідження – біотехнологія лактатдегідрогеназної системи для тестування гліопротекторів АГЗН.

Предмет дослідження – зміна рівнів виживання АГЗН в умовах підвищеного оксидативного стресу.

Методи дослідження. Біотехнологічні методи – культивування первинних тваринних клітин; імуноцитохімічні методи – імуноцитохімічне фарбування клітинних маркерів; біофізичні методи – тести виживання клітин МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразолій бромід), вивільнення ЛДГ, поглинання кальцеїну-АМ (кальцеїн-ацетоксиметил) та тести вимірювання реактивних форм кисню в культурі клітин: CellROX® та DCFDA (2', 7'- дихлорофлуоресциндіацетат); методи статистичної обробки даних з використанням MS Excel, Graph Pad Prism.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше розроблено оригінальну біотехнологію отримання культури первинних АГЗН дорослих щурів, які на відміну від клітин виділених з молодих тварин та людських донорів за загальновідомими протоколами, мають єдину морфологію, а також є більш доречними у дослідженні такого вікового захворювання як глаукома. На основі отриманої культури АГЗН вперше було розроблено лактатдегідрогеназний тест адаптований саме під цю культуру клітин. Наявні методи оцінки оксидативного стресу і рівнів реактивних форм кисню (РФК) також були адаптовані до АГЗН. За допомогою зазначених методик вперше була показана роль гіпербаричного тиску на АГЗН. Було показано,

що гіпербаричний тиск не знижує виживаність АГЗН, але підвищує чутливість АГЗН до оксидативного стресу шляхом збільшення рівня РФК, які генеруються клітинами. Таким чином, в результаті виконаних досліджень була розроблена і науково обґрунтована лактатдегідрогеназна система для тестування гліопротекторів АГЗН.

Практична значимість отриманих результатів. Результати роботи дозволили створити універсальну і високопродуктивну систему тестування фармакологічних субстанцій, спрямованих на гліопротекцію АГЗН. Отримана культура первинних АГЗН і адаптований до неї ЛДГ тест в подальшому можуть бути використані для проведення біохімічних і функціональних досліджень патогенезу глаукоми. Розроблена система тестування гліопротекторів прискорить і спростить вибір нових, більш ефективних лікарських засобів.

Науково-методичні основи розробки лактатдегідрогеназної системи для тестування гліопротекторів астроцитів зорового нерву впроваджено у навчальний процес з біомедичного напрямку аспірантів кафедри біології Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та студентів кафедри молекулярної біології Київського національного університету імені Тараса Шевченка, навчання яких проводиться за участі науковців Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках лекційних занять з курсів «Основи новітньої молекулярної біології і генетики» та «Біотехнології з використанням стовбурових клітин» (Акт впровадження №5 від 07.06.2018 р.).

Результати дослідження впроваджено у навчальний процес на кафедрі біомедичної інженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського, зокрема у лекційний курс навчальної дисципліни «Основи біомедичної інженерії. Біоматеріали та біосумісність» (Акт впровадження від 04.06.2018 р.).

Особистий внесок здобувача. Результати досліджень, представлені в дисертаційній роботі, одержано особисто автором у відділі молекулярної фармакології Чиказького Університету Лойола (Department of Molecular Pharmacology, Loyola University Chicago) та на кафедрі біомедичної інженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського.

Автором особисто здійснено виділення культури первинних астроцитів головки зорового нерва (АГЗН) та удосконалено умови їх культивування; підібрано біотехнологічні підходи для розробки ЛДГ тесту оптимізованого для АГЗН; за допомогою розробленого ЛДГ тесту та комерційних тестів визначено ефекти оксидативного стресу та підвищеного тиску на життєздатність АГЗН та внутрішньоклітинні рівні реактивних форм кисню (РФК). Спільно з співавторами публікацій проведено валідацію розроблених протоколів за допомогою загальновідомих антиоксидантів.

Робота є результатом самостійних досліджень Наумчук Ю.А.

Апробація результатів. Основні положення дисертаційної роботи доповідалися на міжнародних науково-практичних конференціях: Society for Neuroscience Annual Meeting 2018, San Diego, CA, U.S.A.; Society for Neuroscience Annual Meeting 2017, Washington D.C, U.S.A.; Hines VA Research Day, May 2017, U.S.A.; 13th Scientific Meeting of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics 2017, Florence, Italy; Society for Neuroscience Annual Meeting 2015, Program #384.02, Oct 19, 2015, Chicago, IL, U.S.A.; ARVO Meeting 2015, Denver CO, May 2-7, 2015, U.S.A.; Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics Annual Meeting 2015, Charleston, SC, Feb 26-29, 2015, U.S.A.; Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics Annual Meeting 2015, Charleston, SC, Feb 26-29, 2015, U.S.A.; 7th Ocular Diseases Drug Discovery Conference, Mar 19-20, San Diego CA, U.S.A.; ARVO Meeting 2014 Program #2274, Orlando FL, May 3-8, 2014, U.S.A.

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 15 наукових праць, у тому числі 4 статті у іноземних наукових фахових виданнях, 1 стаття у науковому фаховому виданні України, що входить до міжнародних наукометричних баз даних, 10 тез доповідей в збірниках матеріалів наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, шістьох розділів, висновків, додатку та списку використаних джерел з 103 найменувань. Матеріали дисертації викладені на 136 сторінках, містять 30 рисунків, 10 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Огляд літератури

Розділ присвячено біотехнологічним основам методів оцінки клітинних реакцій на вплив факторів оксидативного стресу та перспективі використання культури астроцитів голівки зорового нерву для пошуку гліопротекторних фармакологічних субстанцій для лікування глаукоми.

Розділ 2. Матеріали і методи

Первинну культуру АГЗН отримували з щурів-самців *Rattus norvegicus* віком 9-12 місяців (маса 350 г). Після евтаназії щурів зоровий нерв препарували і промивали у крижаному 0,1 М фосфатному буфері, рН 7,4. Тканину переносили у середовище для росту, яке складалося з середовища Дульбекко (модифікація середовища Ігла, DMEM), доповненого 20% ембріональної телячої сироватки (FBS), з додаванням 100 U/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Тканину голівки зорового нерву з 6 очей об'єднували, а потім нарізали невеликими шматочками. Суспензію тканини трипсинізували протягом 20 хв на водяній бані при 37°C в середовищі для росту з додаванням 0,1% трипсин/ЕДТА. Після трипсинізації суспензію

центрифугували, супернатант аспірували, осад ресуспендували в середовищі для росту та перемішували піпетуванням. Клітинну суспензію потім засіювали в 6-лунковий планшет. Через 7 днів *in vitro* тканинні залишки і супернатант видаляли шляхом вакуумної аспірації і додавали свіже середовище. Далі заміну середовища виконували кожні 72 години. На 14 день *in vitro*, після досягнення майже 90% конфлуентності, АГЗН піддавали трипсинізації та субкультивували.

Для встановлення оптимального покриття поверхні клітини засіювали з щільністю 2500 на лунку в комерційні, оброблені запатентованим субстратом (CC²TM) 96-лункові планшети з оптичним скляним дном, в яких поверхню покривали різними субстратами: ламініном, полі-L-лізином, полі-D-лізином або сумішшю полі-D-лізин/ламінін. Після 48 годин культивування проводили імуноцитохімічний аналіз морфології АГЗН за допомогою флуоресцентних барвників відповідно до рекомендацій виробника: Alexafluor® 488 phalloidin та 4',6-діамідино-2-феніліндол, дихлоргідратом (DAPI).

Імуноцитохімічний аналіз виконували для позитивної ідентифікації клітин як астроцитів за допомогою встановлених маркерів астроцитів: EAAT1, GFAP, і S100β. Клітини мітили подвійною флуоресцентною міткою, за методикою описаною Кажа з співавторами (Кажа et al., 2011, 2012, Кажа, 2015, 2015b).

Для індукції оксидативного стресу АГЗН засіювали в 96-лункові планшети з щільністю 7500 клітин на лунку. Через 48 годин інкубації клітини протягом 5 годин піддавали дії трет-бутилгідропероксиду (tBHP) в зростаючих концентраціях.

Рівень реактивних форм кисню (РФК) після індукції оксидативного стресу за допомогою tBHP в культурі АГЗН кількісно визначали із застосуванням мембрано-проникного флуоресцентного індикатора РФК 2',7'-дихлорофлуоресциндіацетата (DCFDA) відповідно до рекомендацій виробника. Кальцеїновий тест життєздатності АГЗН виконували, як описано раніше для первинної культури кортикальних нейронів (Burroughs, Duncan et al., 2012). МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл) 2,5-дифеніл-тетразолій бромід)-тест виконували за методикою, описаною Кажа зі співавторами для культури астрогліальних клітин HT-22 та первинної культури кортикальних нейронів (Кажа et al., 2011, 2012, Кажа, 2015-го, 2015b). Результати тестів кількісно оцінювали фотометричним методом за допомогою планшетного рідера Synergy H1.

Розробку методу кількісної оцінки вивільнення ЛДГ для АГЗН проводили на основі загальноприйнятого валідованого протоколу для дослідження гліопротекторів у культурі клітин астрогліоми C6. (Кажа et al., 2015). Після 5 годин експозиції клітин з tBHP, 50 мкл культурального

супернатанту переносили в нестерильні прозорі 96-лункові планшети. Додавали 50 мкл тест-реагенту (2 мкМ йодонітротетразолій хлорид (INT), 3,2 мМ β -натрієва сіль нікотинамід аденіндинуклеотиду, 160 мМ лактат літію, 7 мкМ 1-1-метоксифеназин метосульфат (MPMS) в 0,2 М трис-HCl, pH 8,2) Планшети інкубували в темряві при кімнатній температурі протягом 1 години. Реакцію зупиняли додаванням 50 мкл 1М оцтової кислоти. Вивільнення ЛДГ кількісно оцінювали фотометричним методом, вимірюючи поглинання при 490 нм за допомогою планшетного рідера Synergy H1.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою Microsoft Excel і Prism (GraphPad).

Розділ 3. Виділення астроцитів голівки зорового нерву та оптимізація умов культивування

Оптимізація умов культивування та отримання первинної культури АГЗН щурів. Першим кроком у створенні платформи високопродуктивного скринінгу гліопротекторних сполук для лікування глаукоми була розробка вдосконаленої технології отримання та культивування первинної культури астроцитів голівки зорового нерву (АГЗН). Для отримання моношару первинної культури АГЗН ми враховували їхні високі міграційні та проліферативні властивості. Виділення клітин проводили з тканини голівки зорового нерву, отриманої з 6 очних яблук. Тканину подрібнювали, дезінфікували і поміщали в живильне середовище. Після трипсинізації та тритурації отриманої суспензії, клітини розсівали на 6-лункові планшети культивували в інкубаторі при 37°C, 5% CO₂, 95% відносної вологості. Після 7 днів проводили заміну живильного середовища. На 12 день культивування клітинна культура досягла конfluентності 60-70% і була пасажована в співвідношенні 1 до 5.

Паралельно проводили відбір та оптимізацію живильних середовищ для культивування АГЗН. Були протестовані живильні середовища DMEM, RPMI 1640, Ham's 12, Neurobasal та Neurobasal A. За параметрами росту і проліферації АГЗН, найкращі показники були отримані при культивуванні АГЗН в середовищі DMEM (середовище Ігла модифіковане Дульбекко) без додавання пірувату, з додаванням 20% фетальної телячої сироватки (FBS). Вибране середовище сприяло росту астроцитів і обмежувало ріст контамінантних неастроцитарних типів клітин, що дозволило отримати культуру АГЗН єдиної морфології.

Отримана культура АГЗН (рис. 1) була успішно культивована протягом 10 пасажів з пересіванням кожні 72-96 годин. Для проведення подальших експериментів були використані пасажі від 4 до 10.

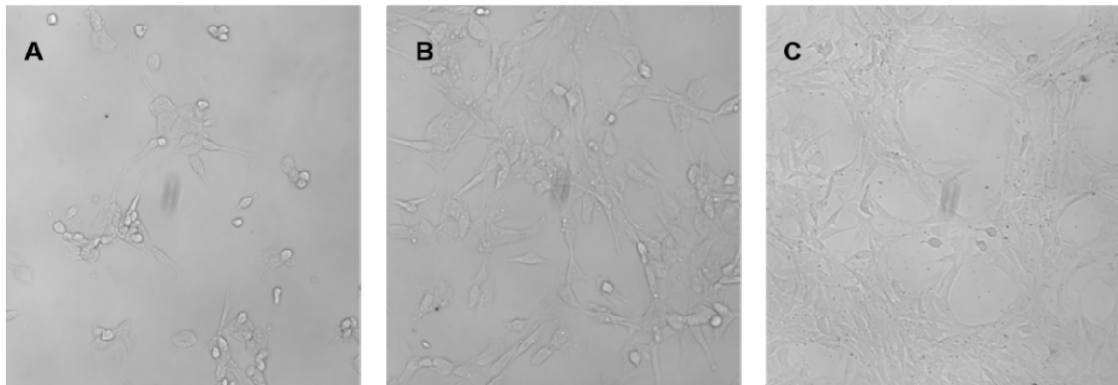


Рис. 1. Репрезентативні зображення культури АГЗН 1-го пасажу після 7 днів *in vitro* (А), 12 днів *in vitro* (В), а також 2-го пасажу після 5 днів *in vitro* (С).

Наступним етапом оптимізації умов культивування АГЗН став вибір покриття поверхні для культивування клітин. Досліджено ріст АГЗН на підложках, покритих ламініном, полі-L-лізином, полі-D-лізином, полі-D-лізин / ламініном і комерційним покриттям CC^{2TM} . На основі отриманих даних отримано криві росту АГЗН та розраховано час подвоєння клітин, який протягом 72 годин спостереження становив від 22 до 29,5 годин. Найбільш швидкий ріст АГЗН, а також найменшу варіабельність часу подвоєння спостерігали на поверхнях покритих полі-L-лізином (рис. 2, $n=9$, $p < 0,001$).

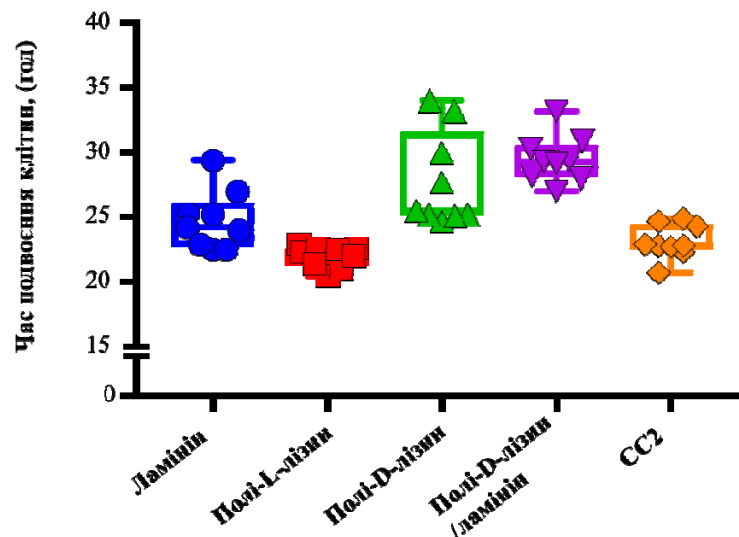


Рис. 2. Час подвоєння для культури первинних АГЗН на різних типах покриттів. Культивування клітин на полі-L-лізині (PLL) і CC^{2TM} забезпечило найбільш швидкий ріст, при цьому при використанні PLL спостерігали найменшу варіабельність, $p < 0,001$.

Для різних поверхонь було проведено імуноцитохімічне дослідження морфології АГЗН. Клітини висівали в 96-лункові планшети, оброблені різними типами покриттів. Після 48 годин інкубації, клітини фіксували в розчині формальдегіду і фарбували з використанням Alexa Fluor TM 488 phalloidin, для візуалізації філаментів актину, а також 4',6-діамідино-2-феніліндол дихлоргідрату (DAPI) для маркування клітинних ядер. Експерименти показали, що клітини які ростуть на полі-L-лізіні, практично не мали ознак ремоделінга актину, в порівнянні з клітинами на інших покриттях. Таким чином, при проведенні імуноцитохімічного аналізу було встановлено, що полі-L-лізін є найкращим покриттям для росту АГЗН.

На наступному етапі були проведені імуноцитохімічні дослідження отриманої культури АГЗН на предмет наявності специфічних маркерів астроцитів, включаючи глутамат-аспартатний транспортер EAAT1, гліальний фібрилярний білок GFAP, та гліальний кальцій-зв'язуючий білок S100 β . В результаті було показано, що отримана культура АГЗН експресувала всі три астроцитарні маркери, EAAT1, GFAP, і S100 β (рис. 3), що підтвердило її приналежність до астроцитів.

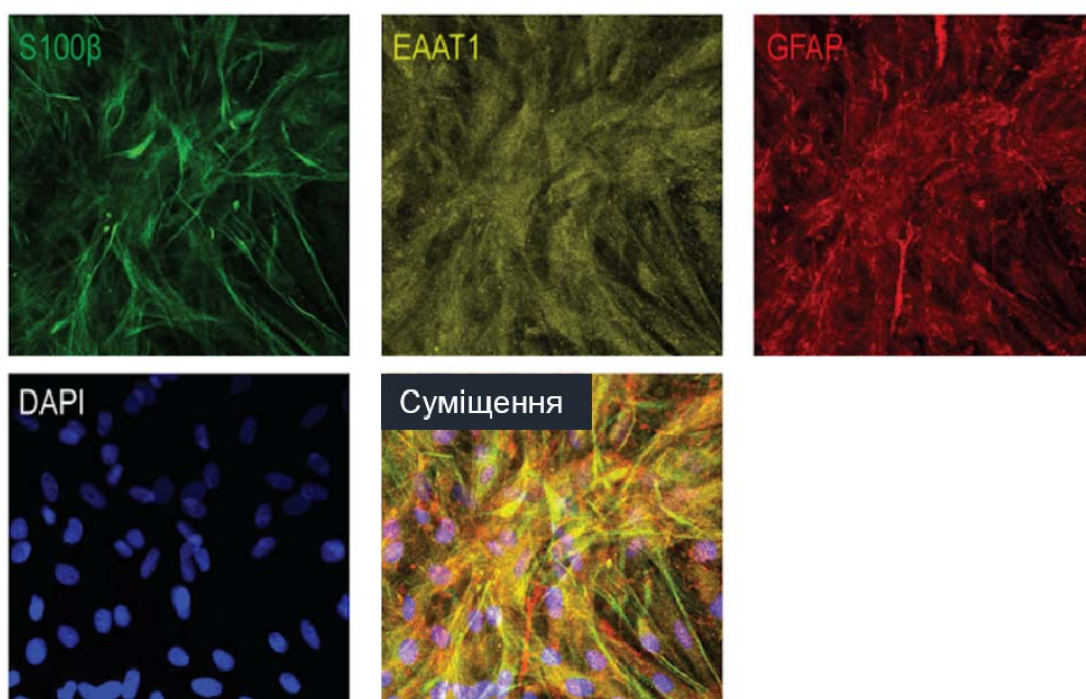


Рис. 3. Імуноцитохімічне дослідження підтвердило експресію основних маркерів астроцитів в отриманій культурі АГЗН: EAAT1 (жовтий), S100 β (зелений) і GFAP (червоний). Ядра пофарбовані за допомогою барвника DAPI (синій).

У додаткових експериментах була протестована імунореактивність отриманої культури АГЗН до мієлінового основного білка (маркер олігодендроцитів) і віментину (маркер фібробластів і активованих астроцитів). В отриманій культурі не був виявлений жодний з цих маркерів, що підтвердило відсутність контамінантних клітинних типів в культурі.

Розділ 4. Розробка лактатдегідрогеназної методики тестування гліопротекторів астроцитів голівки зорового нерву

Розробка та валідація тесту вивільнення ЛДГ для культури АГЗН. Спеціально для розроблюваної скринінгової платформи був вдосконалений тест вивільнення ЛДГ для отриманої культури АГЗН. Для цих цілей був оптимізований тест вивільнення ЛДГ (рис. 4).

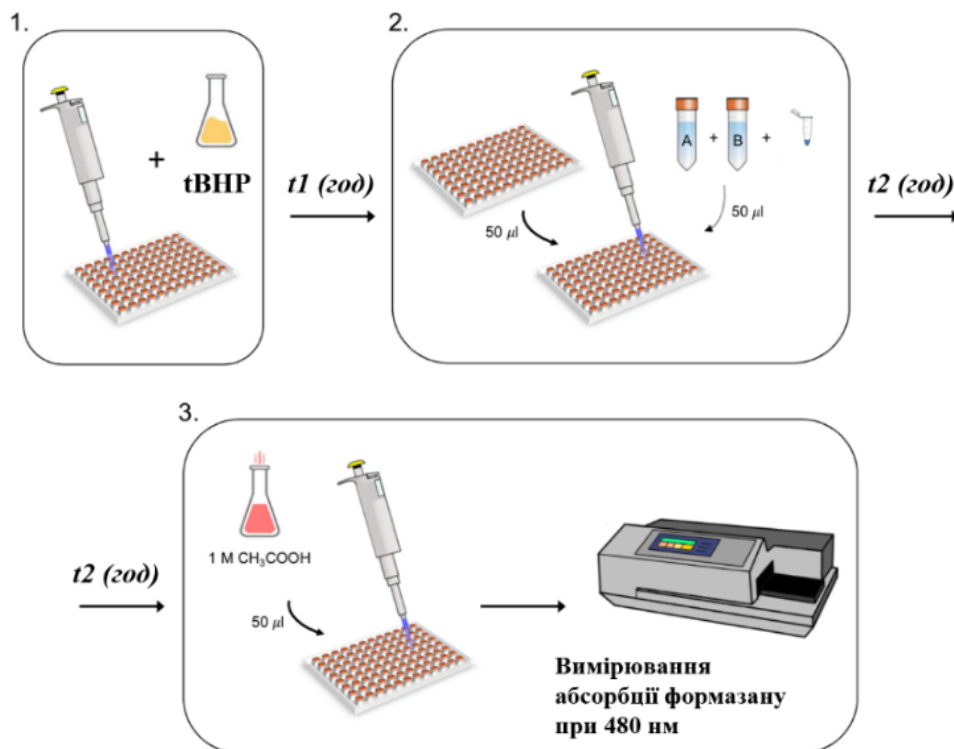


Рис. 4. Принципова схема розробленого ЛДГ тесту

В рамках оптимізації тесту були визначені оптимальні періоди інкубації з $tBHP$ – 5 годин, а також з тест-буфером – 1 година. Розроблений тест вивільнення ЛДГ порівнювали з комерційним тестом. При порівнянні не спостерігалось значних відмінностей в точності аналізу. Наявні комерційні тести вивільнення ЛДГ мають високу вартість (30-100 \$ за 96-лунковий планшет), а також не можуть бути оптимізовані для конкретних умов і клітинних типів через запатентованість компонентного складу. Тому виконана в даній частині роботи оптимізація методу дозволила отримати

ЛДГ тест, який не поступається комерційному аналогу за точністю, але при цьому має нижчу вартість (1,2 \$ за 96-лунковий планшет) і може бути оптимізований для конкретних завдань.

Верифікація дії tBHP як індуктора оксидативного стресу для АГЗН.

На наступному етапі необхідно було надати докази того, що обробка tBHP дійсно викликає збільшення кількості РФК в культурі АГЗН. Верифікація впливу tBHP в якості індуктора оксидативного стресу була проведена за допомогою DCFDA-тесту. Вимірювання флуоресценції DCFDA показало збільшення рівнів РФК зі збільшенням концентрації tBHP, де EC_{50} (tBHP) склала $192,1 \pm 15,7$ мкМ; $n = 40$ (рис 5). При обробці максимальною концентрацією tBHP (500 мкМ) спостерігалось п'ятикратне збільшення флуоресценції DCF в порівнянні з контролем.

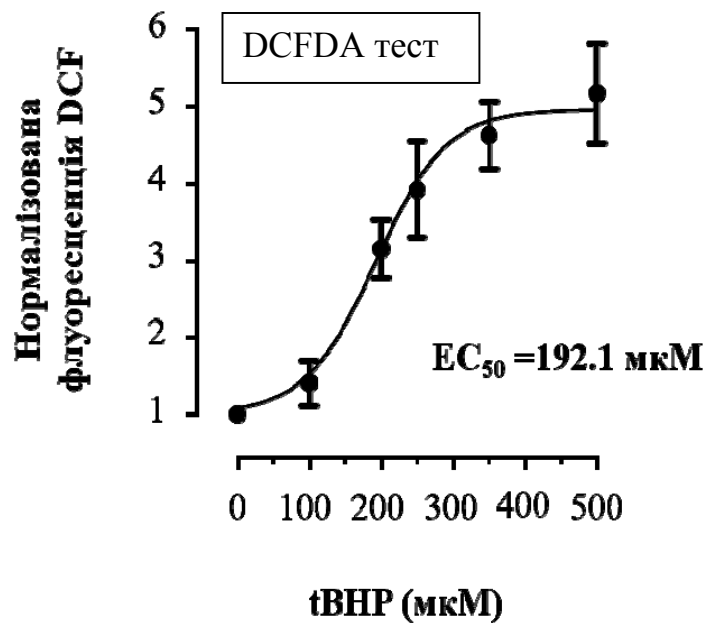


Рис. 5. Залежність продукції РФК від концентрації tBHP в тесті DCFDA

Окрім спеціального аналізу для визначення ЛДГ, ми оптимізували комерційні тести для кількісної оцінки життєздатності клітин АГЗН, а саме Кальцеїн-АМ тест та МТТ-тест. Кальцеїн-АМ тест заснований на поглинанні кальцеїну-АМ. Спостерігається дозозалежне зниження інтенсивності флуоресценції відповідно до збільшення концентрації tBHP. EC_{50} (tBHP) в цьому тесті склала $156,9 \pm 3,8$ мкМ, $n = 24$ (рис. 6), що підтвердило здатність tBHP знижувати виживання клітин в культурі АГЗН.

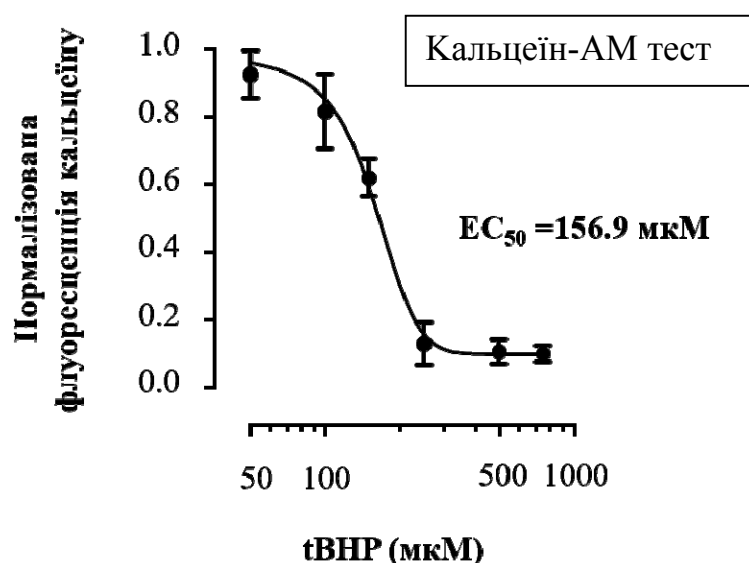


Рис. 6. Залежність флуоресценції кальцеїну від концентрації tBHP в кальцеїн-АМ тесті.

МТТ-тест заснований на відновленні 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)2,5-дифеніл-2Н-тетразолій броміду до формазану, абсорбцію якого вимірюють при $\lambda = 570 \text{ нм}$. EC_{50} у МТТ тесті становила $138,1 \pm 1,4 \text{ мкМ}$ tBHP (Рис. 7, $n = 3$, $p < 0.05$). У МТТ тесті зниження абсорбції формазану відповідало зниженню рівнів виживання АГЗН.

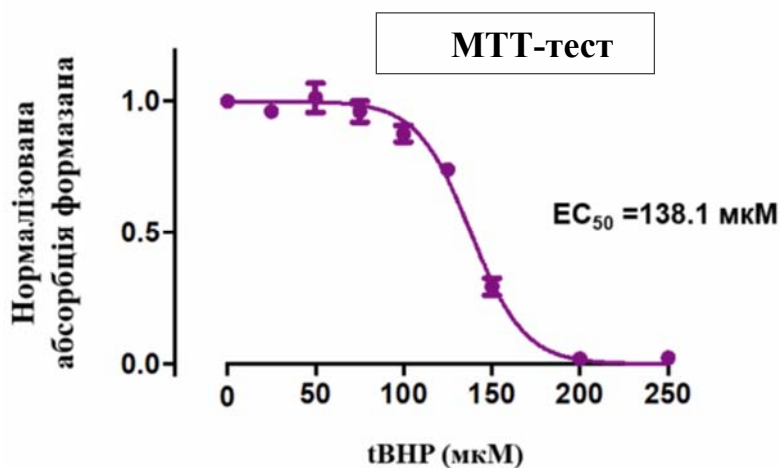


Рис. 7. Залежність абсорбції формазану від концентрації tBHP в МТТ-тесті

Розділ 5. Практичне застосування стандартизованої та валідованої платформи для тестування гліопротекторних сполук

Визначення ефектів гіпербаричного тиску на виживання культури АГЗН. Одним з основних факторів глаукомної патології прийнято вважати підвищений внутрішньо-очний тиск, який призводить до індукції реактивного астроцитозу в голівці зорового нерву. З огляду на роль підвищеного внутрішньоочного тиску і оксидативного стресу в патогенезі глаукоми нами було досліджено їх вплив на культуру АГЗН. Для цього використовували гіпербаричну камеру тиску, яка була розміщена в інкубаторі для культивування клітин і була оснащена апаратурою для моніторингу тиску та складу газового середовища. Дана система також дозволяла контролювано збільшувати тиск до 60 мм. рт. ст.

АГЗН були інкубовані при гіпербаричному тиску 30 мм. рт. ст. протягом 16 годин, після чого вимірювали вивільнення лактатдегідрогенази (ЛДГ) в культурі АГЗН. Критерієм чутливості АГЗН до гіпербаричного тиску був рівень вивільнення ЛДГ в порівнянні з контрольною культурою культивованої при атмосферному тиску. Кількісне визначення ЛДГ не показало відмінностей в виживанні контрольних клітин ($2,00 \pm 0,06$, відн. од.) і клітин після впливу гіпербаричного тиску ($2,01 \pm 0,02$, відн. од.) $n = 48$, $p = 0,65$.

З метою визначення ролі гіпербаричного тиску в процесах оксидативного стресу було досліджено вплив хімічного індуктора оксидативного стресу (tBHP) на АГЗН при атмосферному і гіпербаричному тиску. Виживання клітин визначали з використанням розробленого ЛДГ і комерційного МТТ тестів, для клітин інкубованих в умовах нормального і гіпербаричного тиску (30 мм. рт. ст.). В результаті було показано, що використання зростаючих концентрацій tBHP призводило до зниження виживаності клітин в обох тестах. Крім того, інкубація АГЗН при гіпербаричному тиску підвищувала чутливість АГЗН до дії tBHP. У тесті вивільнення ЛДГ інкубація при гіпербаричному тиску зміщувала EC_{50} (tBHP) з 145,5 до 67,8 мкМ, в тесті МТТ з 178,5 до 83,9 мкМ відповідно, (рис. 8, $n = 24$, $p < 0,05$).

Для уточнення взаємозв'язку основних факторів було визначено вплив гіпербаричного тиску на рівень оксидативного стресу в АГЗН. Візуалізація за допомогою індикатора CellROX показала підвищені рівні реактивних форм кисню (РФК), які проявляються підвищенням інтенсивності зеленого забарвлення в АГЗН, інкубованих при гіпербаричному тиску. Таким чином гіпербаричний тиск призводив до підвищення рівнів РФК в культурі первинних АГЗН. Ділянки підвищеної флуоресценції в ядрах показані білими стрілками (рис. 9).

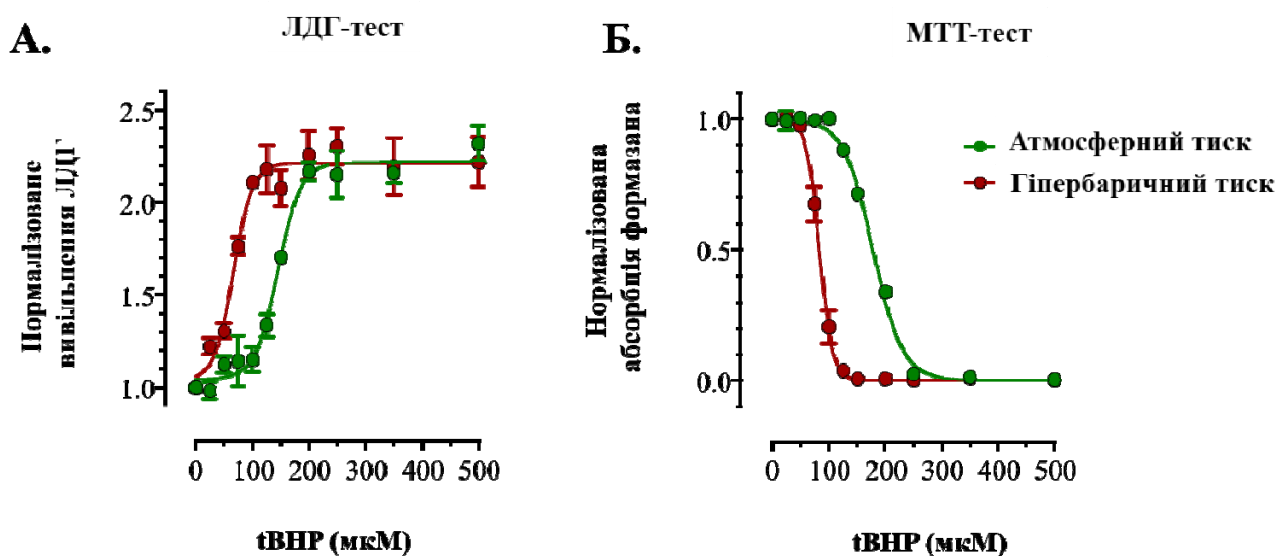


Рис. 8. Залежність життєздатності АГЗН від концентрації tBHP після інкубації при підвищеному та гіпербаричному тиску у тестах ЛДГ (А) і МТТ (Б), $p < 0,05$.

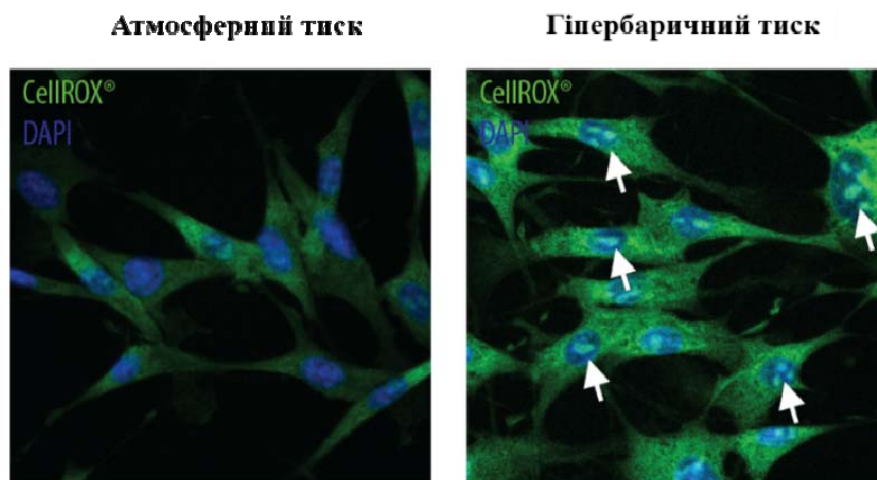


Рис. 9. Репрезентативне зображення АГЗН, забарвлених реагентом CellROX

Доведена відсутність впливу гіпербаричного тиску на виживання клітин в подальшому дозволила застосовувати розроблену технологію в стандартних умовах (атмосферний тиск 760 мм. рт. ст., 5% CO₂, 37 °C, 95% відн. вологість). Крім того, виявлено індукування оксидативного стресу як гіпербаричним тиском, так і tBHP, що дозволило в подальшому використовувати tBHP в якості єдиного індуктора оксидативного стресу, що спростило технологію використання розробленої платформи.

Порівняльна оцінка розроблених та існуючих методик тестування фармакологічних субстанцій для захисту АГЗН з використанням прототипних антиоксидантів. З метою валідації отриманої біотехнології ЛДГ-тесту було проведено порівняння розробленого ЛДГ-тесту з тестом життєздатності МТТ з використанням Тролокса як прототипного антиоксиданта. Було показано, що обробка Тролоксом зміщує EC_{50} (tBHP) вправо з $138,1 \pm 1,4$ мкМ до $192,7 \pm 2,8$ мкМ в МТТ тесті, і з $146,9 \pm 4,9$ мкМ до $246,3 \pm 7,3$ мкМ в ЛДГ тесті. Таким чином, була продемонстрована здатність Тролокса в рівній мірі протидіяти оксидативному стресу, викликаному tBHP в обох тестах (рис. 10, $n = 24$, $p < 0,05$).

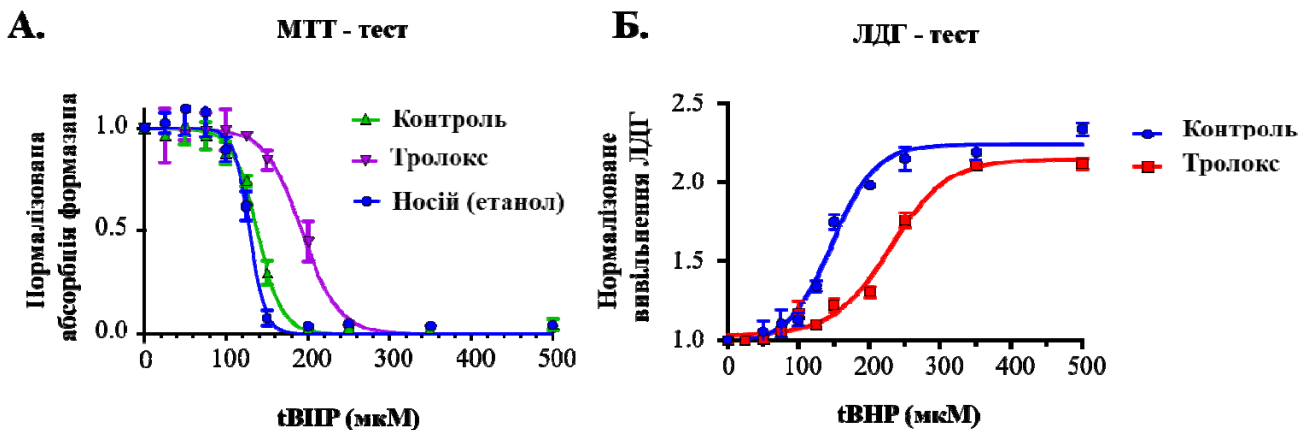


Рис. 10. Залежність життєздатності АГЗН від концентрації tBHP для контролю та після інкубації з Тролоксом у тестах МТТ (А) та ЛДГ (Б), $p < 0,05$.

На завершення ми використовували нашу технологію для встановлення гліопротекторного потенціалу перспективного нутріцевтичного агента Ресвератролу в культурі АГЗН. Попередня обробка АГЗН 20 мкМ Ресвератролом протягом 1 години дозволила збільшити EC_{50} (tBHP) з 145,3 до 248,4 мкМ в ЛДГ тесті, і з 166,5 до 263 мкМ в МТТ (рис. 11, $n = 24$, $p < 0,05$). Таким чином, був показаний значний гліопротекторний потенціал для Ресвератрола. Близькі значення EC_{50} в розробленому нами ЛДГ і в комерційному МТТ тестах підтвердили валідність розробленої методики, а також підтвердили перспективність її використання для тестування гліопротекторного потенціалу сполук з метою лікування глаукоми.

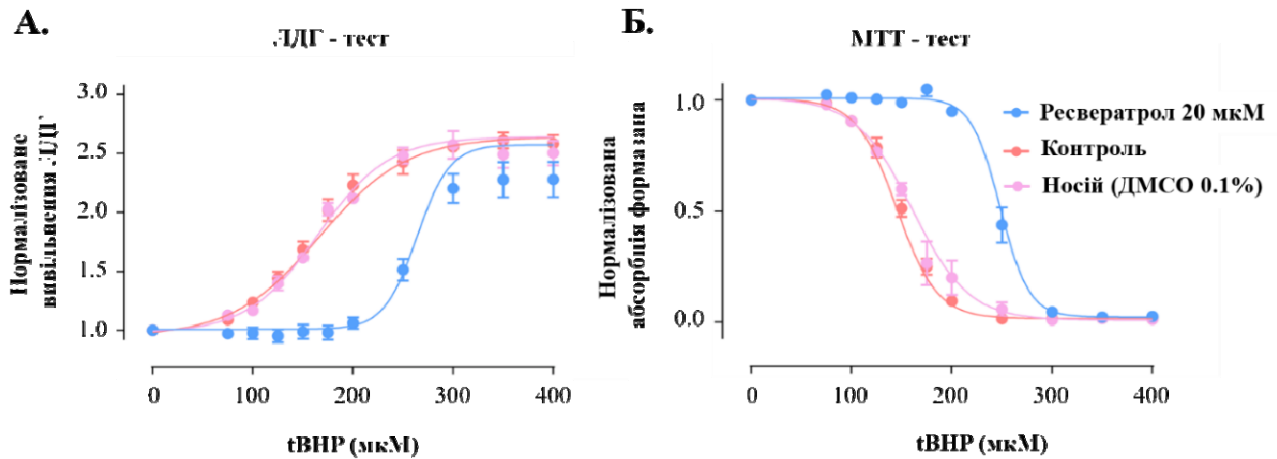


Рис. 11. Залежність життєздатності АГЗН від концентрації tBHP для контролю та після інкубації з Ресвератролом у тестах ЛДГ (А) та МТТ (Б), $p < 0,05$.

Розділ 6. Лактатдегідрогеназна система для визначення гліопротекторних властивостей антиоксидантних речовин (загальне обговорення результатів)

В результаті виконаних досліджень була розроблена і науково обґрунтована лактатдегідрогеназна технологія для тестування гліопротекторів астроцитів зорового нерву, схематично представлена в таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристики лактатдегідрогеназної тест-системи для визначення гліопротекторних властивостей фармакологічних субстанцій перспективних для лікування глаукоми

Засоби та методики	Технологічні умови	Завдання етапу та критерії оцінки
Методи культивування культури тваринних клітин	Середовище культивування АГЗН: DMEM з 4500 мг/л глюкози, 20% ембріональної сироватки телят без додавання пірувату, pH 7.4	Підтримання життєздатної культури АГЗН
	Умови культивування: АГЗН 37°C, 5% CO ₂ , 95% відн. вологість	
Імуноцитохімічне забарвлення АГЗН, Конфокальна мікроскопія	Покриття поверхні скельця для культивування АГЗН: Полі-L-лізин	Імуноцитохімічне підтвердження приналежності АГЗН за наявністю маркерів EAAT1, GFAP, S100b

<i>Засоби та методики</i>	<i>Технологічні умови</i>	<i>Завдання етапу та критерії оцінки</i>
Методи культивування культури тваринних клітин, інкубація АГЗН с агентом оксидативного стресу	Модельна система тестування: Культура первинних АГЗН щура	Проведення першого етапу ЛДГ тесту: індукція оксидативного стресу в АГЗН
	Матриця: 96-лунковий планшет	
	Початкова кількість культивованих клітин: Суспензія із розрахунку 7500 клітин на лунку планшета	
	Час культивування перед індукцією оксидативного стресу: 48 годин	
	Час інкубації з індуктором оксидативного стресу трет-бутил гідропероксидом (tBHP): 5 годин	
Відбір зразків супернатанту АГЗН та їх інкубація з тест реагентом ЛДГ тесту	Об'єм зразку супернатанту: 50 мкл	Проведення другого етапу ЛДГ тесту: проведення спряжених реакцій перетворення лактату в піруват лактатдегідрогеназою, відновлення НАД ⁺ до НАД(Н), та перетворення йодонітротетразолій хлориду у формазан.
	Склад тест-реагенту: 2 мкМ йодонітротетразолій хлорид (INT), 3,2 мМ β-натрієва сіль нікотинамід аденін динуклеотиду, 160 мМ лактат літію, 7 мкМ 1-1-метоксифеназин метосульфату (MPMS) в 0,2 М Тріс-HCl, pH 8,2	
	Час інкубації з тест реагентом: 1 година	
	Об'єм тест-реагенту: 50 мкл	
Методи оптичної колориметрії	Стоп-реагент: 1 М оцтова кислота	Проведення третього етапу ЛДГ тесту: зупинка реакції, вимірювання оптичної абсорбції та ідентифікації життєздатності АГЗН
	Об'єм стоп-реагенту: 50 мкл	
	Час інкубації з тест реагентом: 15 с	
	Довжина хвилі вимірювання оптичної абсорбції: 490 нм	

У таблиці 1 наведене покрокове виконання розробленої технології з визначенням завдання кожного етапу, засобів і методів необхідних для вирішення поставленої задачі, технологічних умов проходження етапу та критеріїв досягнення мети кожного етапу. Представлені дані є узагальненням розробленої технології визначення гліопротекторних властивостей антиоксидантних речовин.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведені теоретичне узагальнення і нові шляхи вирішення наукової задачі, що стосується розробки біотехнологічного методу ефективної оцінки гліопротекторного потенціалу фармакологічних субстанцій перспективних щодо лікування глаукоми. Результати досліджень дають змогу зробити наступні висновки:

1. Розроблено технологію отримання первинної культури астроцитів головки зорового нерву щурів (АГЗН) з підтвердженою імуноцитохімічними маркерами чистотою культури для моделювання умов розвитку глаукоми. Експериментально підтверджено, що оптимальною поверхнею для росту культури АГЗН є полі-L-лізин, який забезпечував найкоротший термін подвоєння (22 год), і найменшу варіабельність параметрів росту при температурі 37 °С відносній вологості 95 % та концентрації CO₂ 5 % на живильному середовищі DMEM з вмістом 4500 мг/л глюкози, 20 % фетальної телячої сироватки без додавання пірувату.

2. Розроблено модифікацію тесту вивільнення лактатдегідрогенази (ЛДГ), що придатна для АГЗН, заснована на оптимальному періоді першої інкубації протягом 5 год з окисдаивним агентом трет-бутилгідропероксидом (tBHP) в діапазоні концентрацій від 0 до 250 мкМ та другій інкубації протягом 1 год з реагентами для проявлення (2 мкМ йодонітротетразолій хлорид, 3,2 мМ β-натрієва сіль нікотинамідаденіндинуклеотиду, 160 мМ лактат літія, 7 мкМ 1-1-метоксифеназин метосульфат в 0,2 М тріс-НСІ, рН 8,2).

3. Ефективність використання tBHP у якості оксидативного агенту в культурі АГЗН була визначена за допомогою тесту на присутність реактивних форм кисню (DCFDA), де напівмаксимальна ефективна концентрація tBHP EC₅₀ склала 192,1 мкМ, та тестів виживання клітин (кальцеїн-АМ та МТТ) у яких EC₅₀ склала 156,9 мкМ та 138,1 мкМ (p < 0,05), відповідно. Це підтвердило ефективність tBHP в якості індуктора оксидативного стресу для моделювання пошкодження АГЗН.

4. Було виявлено підвищення реактивних форм кисню в АГЗН під час реактивного астроцитозу під впливом гіпербаричного тиску. Тому, як альтернатива гіпербаричній дії, був обраний екзогенно індукований оксидативний стрес, з використанням tBHP, як репрезентативна модель для

дослідження, на експериментальній скринінговій платформі, сполук з гліпротекторним терапевтичним потенціалом.

5. Порівняння розробленої системи тестів з існуючими методиками визначення ступеня окисативного стресу підтверджує її високу інформативність для визначення гліпротекторного потенціалу фармакологічних субстанцій. Не виявлено достовірних відмінностей при тестуванні Тролокс: в тесті ЛДГ (tBHP: EC₅₀ = 246,3 мкМ) і в тесті МТТ (tBHP: EC₅₀ = 192,7 мкМ). Для Ресвератрола – в тесті ЛДГ (tBHP: EC₅₀ = 248,4 мкМ) і в тесті МТТ (tBHP: EC₅₀ = 263,8 мкМ). Доведено, що розроблена платформа ЛДГ тестування не поступається за точністю отриманих результатів загальноприйнятим методикам і перевершує їх за простотою та економічністю. Результати роботи дозволяють рекомендувати розроблену платформу ЛДГ-тестування для практичного використання.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Наумчук Ю.А.**, Максименко В.Б., Кая С. Оптимізація тестів життєздатності клітин для скринінгу гліпротекторних сполук у культурі первинних астроцитів головки зорового нерву щура // *Наукові вісті НТУУ “КПІ”*. – 2017. – № 6. – С. 20-26. (Особистий внесок здобувача: проведено планування дослідження, виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів, розробка ЛДГ тесту, оптимізація тестів життєздатності клітин та рівнів РФК, написання тексту статті)

2. Kaja S., Payne A.J., **Naumchuk Y.**, Koulen P. Quantification of lactate dehydrogenase for cell viability testing using cell lines and primary cultured astrocytes // *Current Protocols in Toxicology*. – 2017. Suppl. 72. – P. 2.26.1-2.26.10. (Особистий внесок здобувача: проведено планування дослідження, виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів, розробка ЛДГ тесту, оптимізація тестів життєздатності клітин та рівнів РФК, написання тексту статті)

Науковий журнал входить до наукометричної бази **Scopus**.

3. Kaja S., Payne A.J., **Naumchuk Y.**, Levy D., Zaidi D.H., Altman A.M., Nawazish S., Ghuman J.K., Gerdes B.C., Moore M.A., Koulen P. Plate reader-based cell viability assays for glioprotection using primary rat optic nerve head astrocytes // *Experimental Eye Research*. – 2015. – Vol. 138. – P. 159-166. (Особистий внесок здобувача: проведено планування дослідження, виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів, розробка ЛДГ тесту, оптимізація тестів життєздатності клітин та рівнів РФК, написання тексту статті)

Науковий журнал входить до наукометричних баз **Scopus** та **Web of Science**.

4. Kaja S., Payne A.J., Patel K.R., **Naumchuk Y.**, Koulen P. Differential subcellular Ca²⁺ signaling in a highly specialized subpopulation of astrocytes // *Experimental Neurology*. – 2015. – Vol. 265. – P. 59-68. (Особистий внесок

здобувача: проведено виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів)

Науковий журнал входить до наукометричних баз Scopus та Web of Science.

5. Payne A.J., Kaja S., **Naumchuk Y.**, Kunjukunju N., Koulen P. Antioxidant drug therapy approaches for neuroprotection in chronic diseases of the retina // *International Journal of Molecular Science*. – 2014. – Vol. 15(2). – P. 1865-1886. (Особистий внесок здобувача: проведено огляд і аналіз літератури, написання тексту статті)

Науковий журнал входить до наукометричних баз Scopus та Web of Science.

6. Ghosh A.K., Rao V.R., **Naumchuk Y.**, Stubbs E.B.Jr., Kaja S. Aberrant calcium channel expression is associated with reactive astrocytosis in optic nerve head astrocytes. Society for Neuroscience Annual Meeting 2018, San Diego, CA (Особистий внесок здобувача: проведено виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів)

7. Kaja S, Rao VR, **Naumchuk Y.**, Payne AJ. Intracellular signaling in astrocytes in response to elevated hydrostatic pressure. Society for Neuroscience Annual Meeting 2017, Washington, D.C. (Особистий внесок здобувача: проведено виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів, культивування астроцитів у гіпербаричній камері, проведення тестів життєздатності клітин та рівнів РФК)

8. **Naumchuk Y.**, Rao VR, Floss JC, Rockwell A, Husak V, Kaja S. Characterization of calcium channel expression in primary optic nerve head astrocytes. Hines VA Research Day, May 2017 (Особистий внесок здобувача: проведено виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів, написання тексту тез)

9. **Naumchuk Y.**, Rao VR, Hegel AD, Rockwell A, Husak V, Kaja S. Characterization of calcium channel expression in primary optic nerve head astrocytes. 13th Scientific Meeting of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics 2017, Florence, Italy (Особистий внесок здобувача: проведено виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів, написання тексту тез)

10. Kaja S, Payne AJ, **Naumchuk Y.**, Sieck EG, Voelker DH, Zaidi DH, Koulen P. Glioprotection of adult optic nerve head astrocytes. Society for Neuroscience Annual Meeting 2015, Program #384.02, Oct 19, 2015. Chicago, IL. (Особистий внесок здобувача: проведено планування дослідження, виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів, розробка ЛДГ тесту, оптимізація тестів життєздатності клітин та рівнів РФК, написання тексту тез)

11. Kaja S, Payne AJ, **Naumchuk Y.**, Zaidi DH, Nawazish S, Levy D, Gerdes BC, Koulen P. Novel plate reader-based assay measuring glioprotection in primary adult optic nerve head astrocytes. ARVO Meeting 2015, Denver CO, May 2-7, 2015. (Особистий внесок здобувача: проведено планування дослідження, виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз

отриманої культури астроцитів, розробка ЛДГ тесту, оптимізація тестів життєздатності клітин та рівнів РФК)

12. **Naumchuk Y**, Payne AJ, Patel KR, Kaja S, Koulen P. Differential control of intracellular calcium signaling in primary adult rat optic nerve head astrocytes. Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics Annual Meeting 2015, Charleston, SC, Feb 26-29, 2015. (Особистий внесок здобувача: проведено виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів, написання тексту тез)

13. Kaja S, Payne AJ, **Naumchuk Y**, Zaidi DH, Nawazish S, Levy D, Ghuman JK, Gerdes BC, Koulen P. Novel plate reader-based assay measuring glioprotection in primary optic nerve head astrocytes. Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics Annual Meeting 2015, Charleston, SC, Feb 26-29, 2015. (Особистий внесок здобувача: проведено планування дослідження, виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів, розробка ЛДГ тесту, оптимізація тестів життєздатності клітин та рівнів РФК)

14. Kaja S, Payne AJ, **Naumchuk Y**, Levy DL, Altman AM, Gerdes BC, Koulen P. Primary rat optic nerve head astrocyte culture for glioprotection studies in glaucoma. 7th Ocular Diseases Drug Discovery Conference, Mar 19-20, San Diego CA. (Особистий внесок здобувача: проведено планування дослідження, виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів, розробка ЛДГ тесту, оптимізація тестів життєздатності клітин та рівнів РФК)

15. Koulen P, Payne AJ, Patel KR, **Naumchuk Y**, Kaja S. IP₃ and ryanodine receptors control intracellular calcium signaling in adult rat optic nerve head astrocytes. ARVO Meeting 2014, Program #2274, Orlando FL, May 3-8, 2014. (Особистий внесок здобувача: проведено виділення культури астроцитів, оптимізація умов їх культивування, імуноцитохімічний аналіз отриманої культури астроцитів)

АНОТАЦІЯ

Наумчук Ю.А. Біотехнологічні основи лактатдегідрогеназної системи для тестування гліопротекторів астроцитів зорового нерву. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, 2018

У дисертації представлені результати розробки та оптимізації платформи скринінгу гліопротекторних засобів для лікування глаукоми. Для створення модельної системи тестування гліопротекції був розроблений протокол отримання і культивування первинних астроцитів голівки зорового нерву (АГЗН) з підтвердженими маркерами астроцитів. Для отриманої культури АГЗН були оптимізовані умови культивування та покриття

поверхні. Була проведена модифікація ЛДГ тесту та його адаптація для отриманої культури АГЗН, в рамках якої були оптимізовані періоди інкубації з індуктором оксидативного стресу tBHP і тест-реагентами. Ефективність tBHP як індуктора оксидативного стресу була підтверджена в тестах оцінки рівня реактивних форм кисню (РФК) і виживання клітин. Також було показано, що гіпербарично тиск не впливає на виживаність АГЗН, але при цьому істотно підвищує їх чутливість до оксидативного стресу. Це уможливило подальше використання оксидативного стресу (tBHP) як патогенного фактору впливу при тестуванні засобів гліопротекції. Нарешті, була проведена порівняльна оцінка розробленої ЛДГ системи з комерційним тестом виживання клітин МТТ з використанням прототипного антиоксиданта Тролокса та нутріцетика Ресвератролу. Значення EC_{50} (tBHP), отримані в ЛДГ і МТТ тестах, підтвердили точність розробленої системи.

Ключові слова: глаукома, астроцити голівки зорового нерву, лактатдегідрогеназний тест, оксидативний стрес, гліопротекція

АННОТАЦИЯ

Наумчук Ю.А. Биотехнологические основы лактатдегидрогеназной системы для тестирования глиопротекторов астроцитов зрительного нерва. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского», Киев, 2018.

В диссертации представлены результаты разработки и оптимизации платформы скрининга глиопротекторных средств для лечения глаукомы. Для создания модельной системы тестирования глиопротекции был разработан протокол получения и культивирования первичных астроцитов головки зрительного нерва (АГЗН) с подтвержденными маркерами астроцитов. Для полученной культуры АГЗН были оптимизированы условия культивирования и покрытия поверхности. Была проведена модификация ЛДГ теста и его адаптация для полученной культуры АГЗН, в рамках которой были оптимизированы периоды инкубации с индуктором оксидативного стресса tBHP и тест-реагентами. Эффективность tBHP в качестве индуктора оксидативного стресса была подтверждена в тестах оценки уровня реактивных форм кислорода (РФК) и выживаемости клеток. Также было показано, что гипербарическое давление не влияет на выживаемость АГЗН, но при этом существенно повышает их чувствительность к оксидативному стрессу. Это позволило дальнейшее использования оксидативного стресса (tBHP) в качестве фактора влияния при тестировании средств глиопротекции. Наконец, была проведена сравнительная оценка разработанной ЛДГ системы

с коммерческим тестом выживаемости клеток МТТ с использованием прототипного антиоксиданта Тролокса и нутрицевтика Ресвератрола. Значения EC_{50} (tBHP), полученные в ЛДГ и МТТ тестах, подтвердили точность разработанной системы.

Ключевые слова: глаукома, астроциты головки зрительного нерва, лактатдегидрогеназный тест, оксидативный стресс, глиопротекция.

SUMMARY

Naumchuk Y.A. – Biotechnological basis of a lactate dehydrogenase system for testing glioprotective compounds in optic nerve head astrocytes. – Manuscript.

Thesis to obtain the scientific degree of Candidate of Biological Sciences (PhD) in specialty 03.00.20 – biotechnology. - National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", MES of Ukraine, Kyiv, 2018.

This thesis presents the results of the development and optimization of a standardized plate reader-based screening platform for glioprotective compounds in optic nerve head astrocytes.

Optic nerve head astrocytes (ONHAs) are the major glia cell type in the non-myelinated optic nerve head where they contribute to extracellular matrix synthesis. Pathological changes in glaucoma include reactive astrocytosis, a process characterized by altered astrocyte gene and protein expression and extracellular matrix remodeling. ONHAs are highly sensitive to mechanical and oxidative stresses and crucial for the maintenance of retinal ganglion cell physiology and function. Therefore, glioprotective strategies with the goal to preserve and/or restore the structural and functional viability of ONHAs to slow progression of glaucoma are of high clinical relevance. Available methods for the evaluation of drug candidates with glioprotective potential in ONHAs are poorly developed, laborious and costly, thus causing a challenge for the development of the novel glioprotective strategies. Therefore, the objective of this work was to establish the scientific premise for glioprotection in primary ONHA culture and to develop a biotechnological method for the screening of glioprotective compounds based on their efficacy in reducing or preventing the deleterious effects of oxidative stress in ONHAs.

We formulated the following five specific aims to reach our objective: 1) optimization of the isolation and culturing techniques for primary rat ONHAs; 2) development and validation of a lactate dehydrogenase (LDH) release assay for ONHAs; 3) optimization of chemically-induced oxidative stress to use as an insult in primary rat ONHAs; 4) evaluation of the effects of oxidative stress and hyperbaric pressure on ONHAs; 5) validation of the glioprotective screening platform using antioxidants in primary rat ONHA culture.

We devised a novel protocol for the primary culture of ONHAs derived from adult rats and identified the optimal culture and seeding conditions for the experiments conducted in this thesis.

In order to validate the astrocytic identity of the obtained primary cultures, expression of astrocyte specific markers (excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1), glial fibrillary acidic protein (GFAP), and the glial calcium binding protein S100 β) was confirmed by immunocytochemistry. Minimal to no contamination by other cell types was found.

We next developed a protocol for a custom LDH assay as biotechnological platform for the screening of glioprotective compounds using chemically-induced oxidative stress, *tert*-butylhydroperoxide (tBHP), as an inducer of reactive oxygen species (ROS). Our comparison of the newly developed LDH release assay with a commercially available test kit revealed no statistically significant differences in sensitivity while being far less expensive when compared to the commercial assay. Another important advantage of our custom protocol is the ability to refine the protocol for specific compounds given the known formulation of all reagents.

Next, we optimized the conditions for the use of tBHP as an inducer of oxidative stress in primary rat ONHA culture. The generation of ROS was confirmed using a fluorescent ROS sensor, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). tBHP-induced oxidative stress resulted in a dose-dependent loss of cell viability that was assessed using three different assays, each quantifying a different physiological mechanism that can serve as correlate of cell viability: calcein-AM uptake test, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay and LDH assay. Data from calcein-AM uptake test and MTT assay were compared to the results of the newly developed LDH assay. All three assays yielded similar EC₅₀/IC₅₀ values for tBHP. Therefore, screening of glioprotective compounds using the developed LDH assay is predicted to provide an accurate reflection of the effects of compounds on the physiological function and survival of ONHAs.

Lastly, we validated our biotechnological LDH assay platform for the screening of glioprotective compounds using the prototypic antioxidant Trolox and the nutraceutical Resveratrol. Both compounds exerted potent glioprotective effects with no statistically significant difference between EC₅₀/IC₅₀ values for tBHP obtained from LDH and MTT assays.

In conclusion, we developed and validated a standardized biotechnological screening platform for the quantitative assessment of glioprotective properties in primary adult rat ONHA culture. We recommend the use of our standardized screening platform for advancing the development of novel glioprotective therapeutic strategies for the management of glaucoma.

Keywords: glaucoma, optic nerve head astrocytes, lactatdehydrogenase assay, oxidative stress, glioprotection.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

8-OH-dG – 8-оксо-2'-дезоксигуанозин
 DAPI– 4',6-діамідино-2-феніліндол, дихлоргідрат
 DCF–2',7'-дихлорфлуоресцеїн
 DCFDA – дихлорофлуоресциндіацетат
 DIV – дні *in vitro*
 EAAT1 –глутамат-аспартатний транспортер, підтип 1
 EC₅₀ – напівмаксимальна ефективна концентрація
 ELAM-1 – молекули міжклітинної адгезії (endothelial-leukocyte adhesion molecule 1, E-селектин)
 F12 – Ham's nutrient mixture F12 media
 GFAP – гліальний фібрилярний білок
 GFP – зелений флуоресцентний білок
 H2DCF–2'-7' дихлорофлуоресцин
 H2DCFDA – 2',7'-дихлорофлуоресциндіацет
 H2DCFDA-AM - H2DCFDA ацетометилловий ефір
 HBSS –збалансований сольовий розчин Хенкса
 HEPES– 4-(2-гідроксіетил)-1-піперазин-етансульфо кислота
 INT – йодонітротетразолій хлорид
 MTT – 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)2,5-дифеніл-тетразолій бромід
 PDL – полі-D-лізин
 PDLL – полі-D-лізин / ламінін
 PLL – полі-L-лізин
 S100β – S100 гліальний кальцій зв'язуючий білок B
 SDS – натрію додецилсульфат
 SOD – супероксиддисмутаза
 tBHP – трет-бутилгідропероксид
 АГЗН – астроцити голівки зорового нерву
 BOT – внутрішньоочний тиск
 ГБТ– гіпербаричний тиск
 Кальцеїн-AM – ацетоксиметил-кальцеїновий ефір
 ЛДГ – лактатдегідрогеназа
 РФК – реактивні форми кисню
 Тролокс – 6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхром-2-карбонова кислота